

ISSN 0120-4157

# Biomédica

Revista del Instituto Nacional de Salud

## PUBLICACIÓN ANTICIPADA EN LINEA

El Comité Editorial de *Biomédica* ya aprobó para publicación este manuscrito, teniendo en cuenta los conceptos de los pares académicos que lo evaluaron. Se publica anticipadamente en versión pdf en forma provisional con base en la última versión electrónica del manuscrito pero sin que aún haya sido diagramado ni se le haya hecho la corrección de estilo.

Siéntase libre de descargar, usar, distribuir y citar esta versión preliminar tal y como lo indicamos pero, por favor, recuerde que la versión impresa final y en formato pdf pueden ser diferentes.

### Citación provisional:

**Cerón J, Troncoso J.** Activación microglial en el hipocampo asociada a la lesión del nervio facial. *Biomédica*. 2022;42 (1).

Recibido: 08-07-21

Aceptado: 29-10-21

Publicación en línea: 24-11-21

## **Activación microglial en el hipocampo asociada a la lesión del nervio facial**

### **Lesión del nervio facial activa la microglía en hipocampo**

### **Hippocampal microglial activation associated with facial nerve injury**

Jeimmy Cerón<sup>1</sup>, Julieta Troncoso<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Laboratorio de Neurofisiología Comportamental, Departamento de Ciencias Fisiológicas, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá D.C., Colombia

<sup>2</sup> Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá D.C., Colombia

Correspondencia:

Julieta Troncoso, Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Ciudad Universitaria, Carrera 30 N° 45-02, Edificio 421, Oficina 225, Bogotá D.C., Colombia.

Teléfono: +57 1 316-5000, ext. 11331.

[jtroncoso@unal.edu.co](mailto:jtroncoso@unal.edu.co)

Contribución de los autores:

Jeimmy Cerón: cortes en crióstato del tejido cerebral y captura de imágenes fotográficas para su análisis.

Julieta Troncoso: cirugías de lesión del nervio facial, análisis de resultados y redacción del manuscrito.

Ambas autoras participaron en las pruebas de inmunohistoquímica.

Introducción. Las lesiones del nervio facial afectan la plasticidad a largo plazo en el hipocampo, así como la memoria de reconocimiento de objetos y la memoria espacial, dos procesos dependientes de esta estructura. Si bien se ha descrito una activación microglial en la corteza motora primaria asociada con esta lesión, no se conoce si ocurre algo similar en el hipocampo.

Objetivo. Caracterizar en ratas el efecto de la lesión unilateral del nervio facial sobre la activación de células microgliales en el hipocampo contralateral.

Materiales y métodos. Se realizaron experimentos de inmunohistoquímica para detectar células microgliales en el hipocampo de ratas sometidas a lesión irreversible del nervio facial. Los animales se sacrificaron a distintos tiempos luego de la lesión para evaluar la evolución de la proliferación (densidad de células) y la activación (área celular) de la microglía en tejido hipocampal. Los tejidos cerebrales de animales control se compararon con los de animales lesionados sacrificados a 1, 3, 7, 21 ó 35 días post-lesión.

Resultados. Las células microgliales en el hipocampo de animales con lesión del nervio facial mostraron signos de proliferación y activación a los 3, 7 y 21 días post-lesión. Sin embargo, cinco semanas después estas modificaciones se revirtieron, a pesar de que no hubo recuperación funcional de la parálisis facial.

Conclusiones. La lesión irreversible del nervio facial produce proliferación y activación temprana y transitoria de las células microgliales en el hipocampo. Estos cambios podrían estar asociados con las modificaciones electrofisiológicas y las alteraciones comportamentales dependientes del hipocampo, descritas recientemente.

Palabras clave: nervio facial; hipocampo; inmunohistoquímica; ratas.

**Introduction.** Facial nerve injury induces changes on hippocampal long-term synaptic plasticity and affects object recognition memory and spatial memory consolidation, both hippocampal-dependent tasks. Although microglial activation has been described in the primary motor cortex associated with this type of lesion, it is not known if something similar occurs in the hippocampus. The existence of microglial changes in hippocampal tissue, associated with this peripheral nerve injury, could explain the previously described neuronal changes in this brain structure.

**Objective.** Characterize the effect of the unilateral facial nerve injury on microglial proliferation and activation in contralateral hippocampus.

**Materials and methods.** Immunohistochemical experiments were done to detect microglial cells in hippocampal tissue of rats with facial nerve lesion. The animals were sacrificed at different times after the injury to evaluate the evolution of proliferation (cell's density) and activation (cell's area) of hippocampal microglial cells. Sham-operated animals were compared with lesioned animals sacrificed at 1, 3, 7, 21 or 35 days after injury.

**Results.** The hippocampal microglial cells of facial nerve injured animals showed proliferation and activated phenotype between 3- and 21-days post-lesion. These modifications are transient, since the microglial cells return to the resting state five weeks after injury, despite the irreversible nature of the lesion.

**Conclusions.** Facial nerve injury causes transient proliferation and activation of microglial cells in the hippocampus. This finding could be involved in the generation of morphological and electrophysiological changes described in CA1

pyramidal neurons and in the impairments of spatial memory consolidation, previously observed in facial nerve injured animals.

Key words: facial nerve; hippocampus; immunohistochemistry; rats.

El grupo de investigación de Neurofisiología Comportamental intenta dilucidar, desde hace ya más de una década, los cambios electrofisiológicos, moleculares y morfológicos que ocurren a nivel del sistema nervioso central (SNC) cuando hay una lesión de nervio periférico. Para ello, utiliza el modelo de lesión del nervio facial en roedores por su idoneidad y practicidad (1). Hace unos años se ha descrito que existen modificaciones morfológicas y electrofisiológicas en la corteza motora primaria de las vibrisas (vM1) cuando hay lesión del nervio facial (2,3). De igual manera, se caracterizó la activación de la microglía circundante a vM1 asociada a dicha lesión (4). Recientemente, se observó que, tras lesiones del nervio facial, se producen modificaciones que se extienden más allá de las áreas del cerebro directamente relacionadas con el procesamiento sensitivo-motor a nivel cortical. Más precisamente, ha sido caracterizado que la lesión del nervio facial conduce a una disminución en la potenciación a largo plazo de las sinapsis hipocámpales de CA3 a CA1 (5). Estas modificaciones en la plasticidad del hipocampo, se unen a hallazgos previos que indican que los animales con lesión del nervio facial muestran dificultades para la consolidación de memorias espaciales y, además, presentan elevados niveles de corticosterona plasmática, comparados con animales control (6,7). Sumado a ello, estudios recientes indican que hay una reducción significativa tanto en la complejidad de los árboles dendríticos de las células piramidales de CA1 y CA3, como una disminución significativa de las espinas dendríticas en esas células, asociadas a la lesión del nervio facial (Troncoso J. Deterioro de la memoria espacial y modificaciones funcionales y estructurales en el hipocampo de ratas sometidas a lesión del nervio

facial. Memorias XII Congreso Nacional- XIII Seminario Internacional de Neurociencias 2021. Disponible en: <https://colne.org.co/congreso/#speakers>).

Las células microgliales han sido tradicionalmente consideradas los macrófagos del sistema nervioso central (8). En reposo son células ramificadas que, ante alguna señal inmunológica provocada por daños tisulares, se activan acortando sus procesos, aumentando el número de ramificaciones y adoptando una forma ameboide fagocítica (9-11). Además de su función inmunológica, se sabe que cumplen un papel importante en el monitoreo de la función sináptica, manteniendo su integridad (12-15). Las células microgliales son extremadamente sensibles a perturbaciones producidas por una gran cantidad de variables. Específicamente, se sabe que el estrés puede alterar la estructura y, por lo tanto, la función de las células microgliales (16-18). En ese sentido, se ha descrito que las hormonas relacionadas con el estrés (por ejemplo, la corticosterona y la norepinefrina) producen un cambio estructural de las células microgliales y que estas “remodelaciones” pueden afectar la arquitectura y la función neuronal (19).

En este contexto, el objetivo del presente estudio fue conocer la dinámica de la activación y proliferación de las células de la microglía que rodean las neuronas del hipocampo después de lesiones irreversibles del nervio facial. Estos cambios, podrían explicar, al menos en parte, las modificaciones estructurales y funcionales observadas en esta estructura, así como los impedimentos en tareas de memoria dependientes del hipocampo tras la lesión.

## **Materiales y métodos**

### ***Sujetos experimentales***

Como sujetos experimentales se usaron 24 ratas albinas macho (*Ratus norvegicus*), de la cepa Wistar, de  $290 \pm 20$  gramos, procedentes del Bioterio del Instituto Nacional de Salud, Bogotá, D.C. Los animales se alojaron, en grupos de a cuatro, en cajas de policarbonato (38 x 32 x 18 cm) conteniendo una capa de aserrín en el fondo que era cambiada cada tercer día. Durante el tiempo en que permanecieron en el Laboratorio de Neurociencias, (Universidad Nacional de Colombia) los animales se mantuvieron con humedad ( $40 \pm 5\%$ ) y temperatura ( $20 \pm 3^{\circ}\text{C}$ ) controladas, bajo un ciclo de 12 horas luz-oscuridad (luces encendidas a las 7:00 am) y libre acceso a agua y comida.

### ***Diseño experimental***

Aleatoriamente los 24 animales experimentales se dividieron en dos grandes grupos: Sham (control, con falsa cirugía de lesión,  $n=4$ ) y Lesión irreversible del nervio facial ( $n=20$ ). A su vez, los animales pertenecientes al grupo de Lesión irreversible se subdividieron en: 1D, 3D, 7D, 21D y 35 D (estos animales se sacrificaron a 1, 3, 7, 21 y 35 días post lesión, respectivamente;  $n=4$  cada uno). Los animales del grupo Sham se sacrificaron después de 1 semana de la falsa cirugía de lesión. Un esquema del diseño experimental se muestra en la Figura 1B.

### ***Preparaciones experimentales***

#### **Lesión irreversible de nervio facial**

Al entrar a la cara, el tronco del nervio facial se divide en múltiples ramas (temporal, zigomática, bucal y mandibular, Figura 1A). La lesión irreversible del nervio facial se realizó por corte de las ramas mandibular y bucal (M y B, Figura 1A). Estas ramas son las que inervan la musculatura intrínseca de las vibrissas,



cuya contracción promueve el movimiento activo de estos pelos sensoriales. Para realizar este procedimiento, los animales recibieron anestesia general (Ketamina, 100 mg/Kg + Xilazina, 10 mg/Kg) y se dispusieron en decúbito lateral para afeitar la región preauricular del lado derecho. Se realizó una incisión y luego una disección roma por planos hasta aislar las ramas del nervio facial. Las ramas mandibular y bucal se identificaron mediante estimulación eléctrica y se cortaron retirando un segmento de 1 mm de cada una de ellas. La efectividad de la lesión se confirmó por estimulación eléctrica de las regiones proximales y distales de cada rama lesionada. Los bordes de piel se suturaron con puntos discontinuos utilizando seda 4-0.

#### Falsa cirugía de lesión (Control de lesión, *Sham*)

Los animales se anestesiaron con Ketamina + Xilazina (100 mg/Kg + 10 mg/Kg, respectivamente), se dispusieron decúbito lateral para afeitar la región preauricular del lado derecho y se les realizó una incisión horizontal de 1 cm arriba del ángulo mandibular derecho. Se disecaron las ramas bucal y mandibular del nervio facial, manteniendo intacta su integridad. La incisión en la piel se suturó con puntos discontinuos utilizando seda 4-0.

#### Inmunohistoquímica.

El procedimiento de inmunohistoquímica se realizó de acuerdo a Moreno y cols. (6). Brevemente, los animales se anestesiaron profundamente con uretano (1,6 gr/kg, intraperitoneal). Se realizó la apertura de la cavidad torácica para exponer el corazón y se insertó una cánula en el ventrículo izquierdo con el fin de exanguinar al animal mediante perfusión de solución salina 0.9%, y fijación del tejido cerebral paraformaldehído al 4% preparada en PBS 0.1 M (pH 7.4). Los cerebros se

almacenaron a 4°C en solución fijadora (paraformaldehído al 4 % preparada en solución tampón PBS (Phosphate-Buffered Saline) 0,1 M) durante 48 horas para luego ser transferidos a una solución de sacarosa al 30%, para su crioprotección. Se obtuvieron cortes coronales de 50 µm de grosor, haciendo uso de un criostato a una temperatura de -20°C. Para cada sujeto, se recolectaron y almacenaron secciones de tejido cerebral en un total de cuatro series comprendiendo el hipocampo dorsal (Coordenadas desde Bregma, AP: -1,5 a -4,3 mm) (20).

La inmunorreactividad de la proteína Iba1 (*Ionized calcium binding adaptor molecule 1*, que se expresa de forma específica en macrófagos/microglía) (21) fue detectada empleando antisuero policlonal producido en conejo: anti-Iba1 (Wako, Cat. #019-19741). La unión antígeno-anticuerpo se reveló utilizando el kit ABC (avidina-biotina peroxidasa) de Vectastain (Laboratorios Vector, USA, Ref. PK 6101). Antes del procedimiento se hicieron lavados para retirar el anticongelante (2 x 10 minutos, PB 0.1 M). Posteriormente, se realizó el bloqueo de la peroxidasa endógena incubando los tejidos en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 1%, durante veinte minutos. Seguido a ello, se procedió a bloquear los sitios de unión inespecíficos con albúmina de suero bovino (BSA 1 %. Sigma, Ref. A7030-100G) y suero normal de cabra (1%. Laboratorios Vector, USA, Ref. S-1000). Las secciones se incubaron toda la noche con el anticuerpo primario (anti-Iba1) (1:1000, en la solución de bloqueo) a temperatura ambiente y en agitación. Posteriormente, se inició la incubación con el anticuerpo secundario biotinilado anti-conejo producido en cabra (Laboratorios Vector, USA, Ref. PK 6101; 1:250, PB-Tritón, BSA 0,3%, suero normal de cabra 0,3%), durante dos horas en agitación a temperatura ambiente. Luego, las secciones se incubaron con solución de avidina-biotina

durante dos horas, se lavaron nuevamente en PB 0.1 M, y se inició el proceso de revelado empleando una solución de 3.3'-diaminobenzidina (DAB 0,05%, Laboratorios Vector, USA, Ref. SK-4100). Los cortes de tejido cerebral se montaron con pincel en portaobjetos previamente gelatinizados para evitar su despegue; una vez que los cortes se secaron por completo, se colocó el cubreobjetos (que fue adherido mediante bálsamo de Canadá) para su posterior visualización en el microscopio de luz.

### ***Análisis de datos y pruebas estadísticas***

El análisis de las células positivas para Iba1, tanto del conteo como del área se sometieron a pruebas estadísticas de ANOVA de una vía para establecer diferencias significativas entre grupos. Las células positivas para Iba-1, así como su área, se cuantificaron en las fotografías ampliadas de los cortes histológicos observados con microscopía óptica de luz a 400 aumentos, utilizando el software *Image J*. Se evaluó la densidad y el área de las células microgliales de toda la formación hipocampal, seleccionando aleatoriamente campos ópticos de cada una de las áreas estudiadas (CA1, CA3 y giro dentado). Antes de los análisis, se realizó la calibración del software, configurando la equivalencia micras/píxeles, por medio de imágenes de una escala micrométrica. En las fotografías de interés se ajustó la profundidad de color a 8 bits y se convirtieron en imágenes pseudo-binarias a través de la función *Threshold*, indicando posteriormente al programa los parámetros a medir. Las comparaciones planeadas se realizaron con el método Holm-Sidak. Se utilizó un valor crítico de significancia de 0,05.

### ***Consideraciones éticas***

Las condiciones de alojamiento, la totalidad de los procedimientos experimentales y la disposición de los residuos biológicos y químicos se realizaron observando las normativas nacionales e internacionales pertinentes: Resolución n° 008430 de 1993 del Ministerio de Salud y Ley 84 del 27 de diciembre de 1989, además de lo estipulado en la resolución 2378 de 2008 del Ministerio de Protección Social. Los experimentos de este trabajo fueron avalados por el Comité de Ética de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Colombia. Se hizo un esfuerzo para reducir el número de animales a utilizar, evitando el sufrimiento innecesario de los mismos. También se tuvieron en cuenta los procedimientos para el manejo y cuidado de animales de laboratorio recomendados por la normativa de la Unión Europea (8616091EU) y los Institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos de América (*National Research Council*, 2010).

### **Resultados**

Los animales sometidos a lesión de las ramas bucal y mandibular del nervio facial mostraron una parálisis facial del tercio inferior de la cara, tal y como se esperaba debido a este tipo de lesión. Esta parálisis se evidenció por ausencia de movimientos activos de las vibrisas del lado lesionado, en comparación a los animales control sin lesión (Sham) (Figura 1C). Durante la primera semana post-lesión, los animales mostraron una retracción completa de las vibrisas del lado lesionado (grupos 1D y 3D). Sin embargo, a partir de la semana posterior a la lesión, las vibrisas recuperaron tonicidad, aunque continuaron paralizadas (grupos 7D, 21D, 35D). De hecho, debido a que la lesión se realizó cortando y retirando una parte de cada rama del nervio facial, se impidió la reinervación y, por lo tanto,

la posibilidad de la recuperación de la función motora (parálisis irreversible) (Figura 1C).

La figura 2A muestra fotografías a distintos aumentos (50x, 100x y 400x) del hipocampo contralateral al lado lesionado, de animales representativos de cada grupo experimental, comparados con los animales control (Sham). La inmunorreactividad de la proteína Iba1 del hipocampo correspondiente a los animales con falsa cirugía de lesión (Sham) se puede observar que las células de la microglía presentan una morfología típica de células residentes en reposo, caracterizado por un cuerpo celular pequeño acompañado por procesos largos y ramificados (Figura 2A, panel superior). Sin embargo, cuando se analizan las células microgliales hipocámpales de animales sacrificados a distintos intervalos posteriores a la axotomía del nervio facial, se observan cambios evidentes tanto en su morfología como en su densidad numérica. Por una parte, es evidente que la lesión irreversible del nervio facial produce una proliferación de las células microgliales. El análisis de varianza arroja diferencias significativas en el número de células positivas para Iba-1, respecto del grupo control ( $F_{(5,90)} = 21,98$ ,  $p < 0,001$ ). Específicamente, las comparaciones planeadas muestran que hay mayor número de células de la microglía a los 3 días (Sham vs 3D,  $t = 8,28$ ,  $p < 0,001$ ), 7 días (Sham vs 7D,  $t = 4,99$ ,  $p < 0,001$ ) ó 21 días (Sham vs 21D,  $t = 4,77$ ,  $p < 0,001$ ) posteriores a la lesión (Figura 2B). Por otra parte, no se encontraron diferencias significativas en el número de células microgliales en el hipocampo de animales sacrificados a 1 día (Sham vs 1D,  $t = 0,80$ ,  $p = 0,42$ ), o 35 días (Sham vs 35D,  $t = 0,37$ ,  $p = 0,71$ ), post-lesión. Esto indica que el aumento del número de células microgliales en el hipocampo asociado a la lesión es de aparición

temprana, ya que se manifiesta a partir del tercer día posterior a la lesión.

Además, esta proliferación es transitoria, ya que cinco semanas post-lesión hay una recuperación en patrón de distribución células microgliales muy similar al del grupo control (a pesar de no haber una recuperación de la función motora).

Por otro lado, es evidente que la forma de las células microgliales cambia con la axotomía del nervio facial: presentan alteraciones morfológicas de engrosamiento y retracción de sus ramificaciones, con cuerpos celulares agrandados, que se hacen evidentes desde el tercer día post-lesión (Figura 2A). El análisis de varianza muestra diferencias significativas en el área de los somas de las células microgliales tras la lesión, en comparación con el grupo control ( $F_{(5,426)} = 276,59$ ,  $p < 0,001$ ). Específicamente, se encontraron aumentos en el área somática microglial de la formación hipocampal de animales sacrificados a los 3 días (Sham vs 3D,  $t = 28,51$ ,  $p < 0,001$ ), 7 días (Sham vs 7D,  $t = 15,45$ ,  $p < 0,001$ ) ó 21 días (Sham vs 21D,  $t = 11,57$ ,  $p < 0,001$ ) posteriores a la lesión (Figura 2C). Por otra parte, no se encontraron diferencias significativas en el área de las células microgliales de los animales sacrificados a 1 día (Sham vs 1D,  $t = 0,28$ ,  $p = 0,35$ ), o 35 días (Sham vs 35D,  $t = 0,93$ ,  $p = 0,78$ ), post-lesión, en comparación con el control. Esto estaría indicando que hay una activación de las células microgliales, con agrandamiento del soma y reducción de los procesos, que es temprana (ya que se evidencia a partir de los 3 días post-lesión). Esta activación, sin embargo, es transitoria, ya que la microglía retorna a sus niveles de activación basales, evidenciando características morfológicas similares animales sometidos a falsa cirugía, a las cinco semanas posteriores a la axotomía.

## **Discusión**

En este trabajo se caracterizó la evolución de la proliferación y activación de las células microgliales hipocampales, asociadas a la lesión del nervio facial. Esta modificación es de aparición temprana pero transitoria, dado que se hace evidente a los tres días posteriores a la lesión, pero se revierte cinco semanas después, a pesar de que no hay recuperación de la función motora (dada la naturaleza irreversible de la lesión). En trabajos previos se había descrito una activación microglial similar en la corteza motora primaria de las vibrisas (4), que se asoció con modificaciones estructurales y electrofisiológicas de las células piramidales corticales que realizan conexiones monosinápticas directas con el núcleo del facial (2,3).

Hay abundante evidencia de que el hipocampo de los mamíferos cumple un papel fundamental en la navegación en ambientes familiares y novedosos, así como en el aprendizaje y la memoria de la ubicación de objetos o lugares en el espacio (22-25). Las ratas son animales nocturnos que dependen de forma importante de sus habilidades de navegación para explorar su ambiente; esta navegación requiere del uso activo de las vibrisas faciales, las cuales funcionan como órganos táctiles de alta sensibilidad para la exploración activa de objetos y texturas, así como la detección de la distancia a la que se encuentran los objetos (26). De forma consistente, hay evidencia que muestra que el hipocampo recibe y procesa información somatosensorial adquirida mediante el movimiento activo de las vibrisas faciales en la rata (27).

Trabajos previos a este han permitido demostrar que la lesión del nervio facial está relacionada con impedimentos en la consolidación de memorias dependientes del

hipocampo (memoria de reconocimiento de objetos y memoria espacial) (6,7).

Esos hallazgos, sumados a recientes descripciones que indican que la potenciación a largo plazo en el hipocampo de animales con lesión del nervio facial es significativamente menor que en animales control (5), indican que el hipocampo es una estructura susceptible de sufrir modificaciones funcionales por lesiones periféricas. De hecho, así se ha demostrado hace algunos años con lesiones del nervio ciático (28). Estas modificaciones funcionales, junto con los cambios morfológicos caracterizados en las células piramidales de CA1 y CA3 asociados con la lesión del nervio facial (Troncoso J. Deterioro de la memoria espacial y modificaciones funcionales y estructurales en el hipocampo de ratas sometidas a lesión del nervio facial. Memorias XII Congreso Nacional- XIII

Seminario Internacional de Neurociencias 2021. Disponible en:

<https://colne.org.co/congreso/#speakers>), podrían estar mediadas por alteraciones en la microglía circundante observadas en este trabajo. De hecho, existe evidencia de que lesiones de nervio periféricos que producen dolor crónico, por ejemplo, provocan activación de la glía (microglía y astrocitos) y de citoquinas proinflamatorias, que contribuyen a la remodelación estructural del hipocampo y las funciones cognitivas que le subyacen (29-32).

La axotomía del nervio facial provoca una parálisis de las vibrisas que conduce a una modificación del procesamiento de información sensorio-motor, debido a la alteración de la adquisición activa de información sensorial. Si bien es conocido que el hipocampo no tiene conexión directa con las motoneuronas faciales lesionadas, se sabe que la vM1 envía información al *núcleo reuniens* (33) y que éste, a su vez, proyecta sobre las células piramidales de CA1 del hipocampo (34).



Entonces, la pasividad inducida por la axotomía del nervio facial de las entradas táctiles de las vibrisas puede causar un desequilibrio crítico en este sistema, no solo por la degradación de las entradas del trigémino a la vM1 y al *núcleo reuniens*, sino también por la modificación fisiológica y estructural de las neuronas piramidales de la capa 5 de la vM1, como se ha observado en trabajos previos (2-4).

El hipocampo es una estructura altamente sensible a eventos estresantes. De hecho, está descrito que el estrés agudo o crónico produce una activación microglial en varias estructuras del sistema nervioso central, incluido el hipocampo (35). Se ha observado que, tras lesiones del nervio facial, se produce un aumento significativo de los niveles plasmáticos de corticosterona (7) que podría estar relacionado con el aumento en la proliferación y activación microglial descritos en este trabajo.

Por último, se conoce que la microglía es capaz de remodelar estructuralmente las neuronas y, por lo tanto, modificar su función. De este modo, los hallazgos descritos aquí podrían explicar, al menos en parte, la disminución en la potenciación a largo plazo (LTP), las modificaciones morfológicas neuronales en las células de CA3 y CA1 y los impedimentos en la consolidación de tareas dependientes del hipocampo, observadas previamente (5,7)(Troncoso J. Deterioro de la memoria espacial y modificaciones funcionales y estructurales en el hipocampo de ratas sometidas a lesión del nervio facial. Memorias XII Congreso Nacional- XIII Seminario Internacional de Neurociencias 2021. Disponible en: <https://colne.org.co/congreso/#speakers>).

## Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflicto de interés alguno.

## Financiación

Este trabajo ha sido financiado por la Fundación para la promoción de la Investigación y la Tecnología - FITP (proyectos N° 3380 y N°4374) del Banco de la República de Colombia

## Referencias

1. **Moran LB, Graeber MB.** The facial nerve axotomy model. Brain Res Brain Res Rev. 2004;44:154-78. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2003.11.004>
2. **Múnera A, Cuestas DM, Troncoso J.** Peripheral facial nerve lesions induce changes in the firing properties of primary motor cortex layer 5 pyramidal cells. Neuroscience. 2012;223:140-51. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.07.063>
3. **Urrego D, Múnera A, Troncoso J.** [Peripheral facial nerve lesion induced long-term dendritic retraction in pyramidal cortico-facial neurons]. Biomédica. 2011;31:560-9. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v31i4.440>
4. **Urrego D, Troncoso J, Múnera A.** Layer 5 pyramidal neurons' dendritic remodeling and increased microglial density in primary motor cortex in a murine model of facial paralysis. Biomed Res Int. 2015;2015:482023. <https://doi.org/10.1155/2015/482023>
5. **Torrado-Arévalo R, Troncoso J, Múnera A.** Facial nerve axotomy induces changes on hippocampal CA3-to-CA1 long-term synaptic plasticity. Neuroscience. 2021;475:197-205. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2021.08.023>

6. **Moreno C, Vivas O, Lamprea NP, Lamprea MR, Múnera A, Troncoso J.** Vibrissal paralysis unveils a preference for textural rather than positional novelty in the one-trial object recognition task in rats. *Behav Brain Res.* 2010;211:229-35. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2010.03.044>
7. **Patarroyo WE, García-Perez M, Lamprea M, Múnera A, Troncoso J.** Vibrissal paralysis produces increased corticosterone levels and impairment of spatial memory retrieval. *Behav Brain Res.* 2017;320:58-66. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2016.11.045>
8. **Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F.** Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science.* 2005;308:1314-8. <https://doi.org/10.1126/science.11110647>
9. **Davalos D, Grutzendler J, Yang G, Kim JV, Zuo Y, Jung S, et al.** ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nat Neurosci.* 2005;8:752-8. <https://doi.org/10.1038/nn1472>
10. **Ulland TK, Wang Y, Colonna M.** Regulation of microglial survival and proliferation in health and diseases. *Semin Immunol.* 2015;27:410-5. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2016.03.011>
11. **Colonna M, Butovsky O.** Microglia function in the central nervous system during health and neurodegeneration. *Annu Rev Immunol.* 2017;35:441-68. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-051116-052358>
12. **Tremblay M-È, Lowery RL, Majewska AK.** Microglial interactions with synapses are modulated by visual experience. *PLOS Biol.* 2010;8:e1000527. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000527>

13. **Wake H, Moorhouse AJ, Jinno S, Kohsaka S, Nabekura J.** Resting Microglia Directly Monitor the Functional State of Synapses In Vivo and Determine the Fate of Ischemic Terminals. *J Neurosci.* 2009;29:3974-80. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4363-08.2009> 15.
14. **Paolicelli RC, Bolasco G, Pagani F, Maggi L, Scianni M, Panzanelli P, et al.** Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development. *Science.* 2011;333:1456-8. <https://doi.org/10.1126/science.1202529>
15. **Schafer DP, Lehrman EK, Kautzman AG, Koyama R, Mardinly AR, Yamasaki R, et al.** Microglia sculpt postnatal neural circuits in an activity and complement-dependent manner. *Neuron.* 2012;74:691-705. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.03.026>
16. **Tynan RJ, Naicker S, Hinwood M, Nalivaiko E, Buller KM, Pow DV, et al.** Chronic stress alters the density and morphology of microglia in a subset of stress-responsive brain regions. *Brain Behav Immun.* 2010;24:1058-68. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2010.02.001>
17. **Hinwood M, Tynan RJ, Charnley JL, Beynon SB, Day TA, Walker FR.** Chronic stress induced remodeling of the prefrontal cortex: structural re-organization of microglia and the inhibitory effect of minocycline. *Cereb Cortex.* 2013;23:1784-97. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2010.02.001>
18. **Jauregui-Huerta F, Ruvalcaba-Delgadillo Y, Gonzalez-Castañeda R, Garcia-Estrada J, Gonzalez-Perez O, Luquin S.** Responses of glial cells to stress and glucocorticoids. *Curr Immunol Rev.* 2010;6:195-204. <https://doi.org/10.2174/157339510791823790>

19. **Walker FR, Nilsson M, Jones K.** Acute and chronic stress-induced disturbances of microglial plasticity, phenotype and function. *Curr Drug Targets.* 2013;14:1262-76. <https://doi.org/10.2174/13894501113149990208>
20. **Paxinos G, Watson C.** The rat brain in stereotaxic coordinates-The New Coronal Set. 6th Edition. London, UK: Academic Press; 2007.
21. **Ito D, Imai Y, Ohsawa K, Nakajima K, Fukuuchi Y, Kohsaka S.** Microglia-specific localisation of a novel calcium binding protein, Iba1. *Brain Res Mol Brain Res.* 1998;57:1-9. [https://doi.org/10.1016/s0169-328x\(98\)00040-0](https://doi.org/10.1016/s0169-328x(98)00040-0)
22. **Hill AJ.** First occurrence of hippocampal spatial firing in a new environment. *Exp Neurol.* 1978;62:282-97. [https://doi.org/10.1016/0014-4886\(78\)90058-4](https://doi.org/10.1016/0014-4886(78)90058-4)
23. **Schmajuk NA.** Role of the hippocampus in temporal and spatial navigation: an adaptive neural network. *Behav Brain Res.* 1990;39:205-29. [https://doi.org/10.1016/0166-4328\(90\)90028-d](https://doi.org/10.1016/0166-4328(90)90028-d)
24. **Gulli RA, Duong LR, Corrigan BW, Doucet G, Williams S, Fusi S, et al.** Context-dependent representations of objects and space in the primate hippocampus during virtual navigation. *Nat Neurosci.* 2020;23:103-12. <https://doi.org/10.1038/s41593-019-0548-3>
25. **Bird CM.** The role of the hippocampus in recognition memory. *Cortex.* 2017;93:155-65. <https://doi.org/10.1016/j.cortex.2017.05.016>
26. **Hartmann MJ, Johnson NJ, Towal RB, Assad C.** Mechanical characteristics of rat vibrissae: resonant frequencies and damping in isolated whiskers and in the awake behaving animal. *J Neurosci.* 2003;23:6510-9. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-16-06510.2003>

27. **Bellistri E, Aguilar J, Brotons-Mas JR, Foffani G, Prida LM de la.** Basic properties of somatosensory-evoked responses in the dorsal hippocampus of the rat. *J Physiol.* 2013;591:2667-86.  
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2013.251892>
28. **Ren W-J, Liu Y, Zhou L-J, Li W, Zhong Y, Pang R-P, et al.** Peripheral nerve injury leads to working memory deficits and dysfunction of the hippocampus by upregulation of TNF- $\alpha$  in rodents. *Neuropsychopharmacology.* 2011;36:979-92. <https://doi.org/10.1038/npp.2010.236>
29. **Fasick V, Spengler RN, Samankan S, Nader ND, Ignatowski TA.** The hippocampus and TNF: Common links between chronic pain and depression. *Neurosci Biobehav Rev.* 2015;53:139-59.  
<https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2015.03.014>
30. **Fiore NT, Austin PJ.** Peripheral nerve injury triggers neuroinflammation in the medial prefrontal cortex and ventral hippocampus in a subgroup of rats with coincident affective behavioural changes. *Neuroscience.* 2019;416:147-67.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2019.08.005>
31. **Fiore NT, Austin PJ.** Are the emergence of affective disturbances in neuropathic pain states contingent on supraspinal neuroinflammation? *Brain Behav Immun.* 2016;56:397-411. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2016.04.012>
32. **Liu Y, Zhou L-J, Wang J, Li D, Ren W-J, Peng J, et al.** TNF- $\alpha$  differentially regulates synaptic plasticity in the hippocampus and spinal cord by microglia-dependent mechanisms after peripheral nerve injury. *J Neurosci.* 2017;37:871-81. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2235-16.2016>

33. **McKenna JT, Vertes RP.** Afferent projections to nucleus reuniens of the thalamus. *J Comp Neurol.* 2004;480:115-42. <https://doi.org/10.1002/cne.20342>
34. **Vertes RP, Hoover WB, Valle ACD, Sherman A, Rodriguez JJ.** Efferent projections of reuniens and rhomboid nuclei of the thalamus in the rat. *J Comp Neurol.* 2006;499:768-96. <https://doi.org/10.1002/cne.21135>
35. **Wang Y-L, Han Q-Q, Gong W-Q, Pan D-H, Wang L-Z, Hu W, et al.** Microglial activation mediates chronic mild stress-induced depressive- and anxiety-like behavior in adult rats. *J Neuroinflammation.* 2018;15:21. <https://doi.org/10.1186/s12974-018-1054-3>

## Figuras

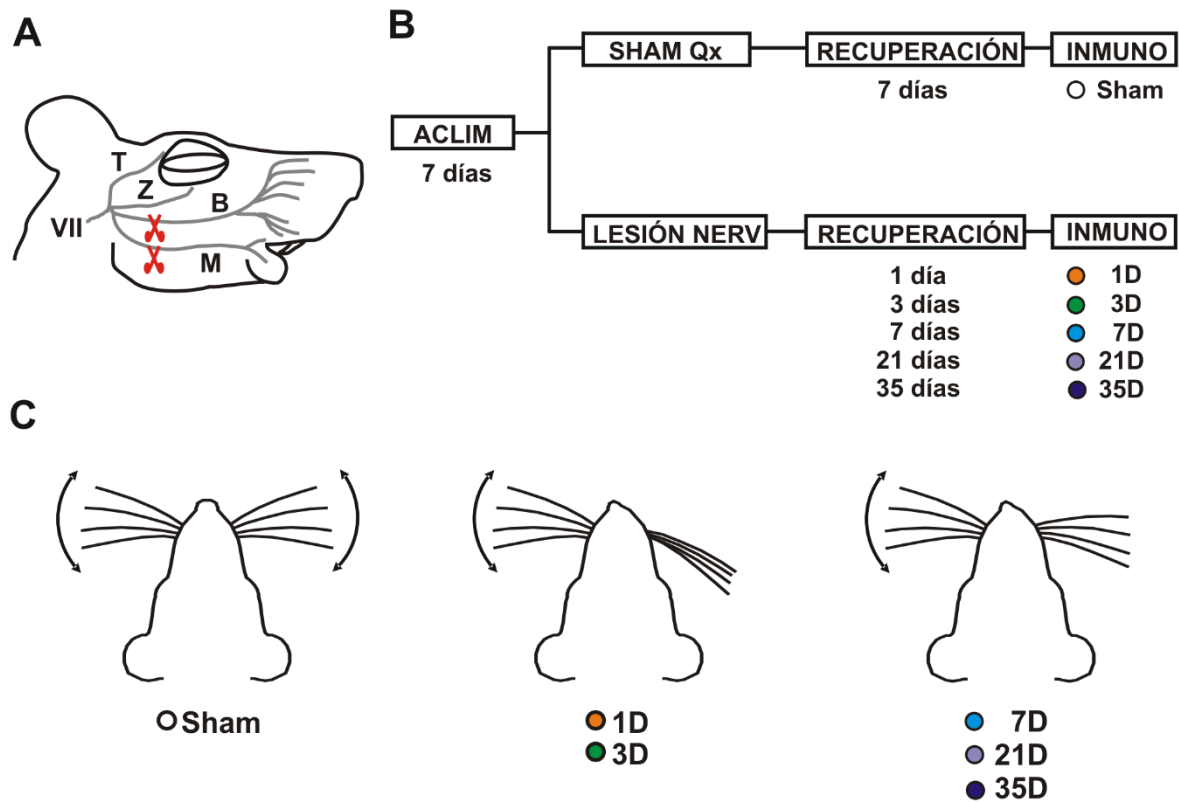


Figura 1. Metodología, diseño experimental y efectos de la lesión en la función motora. A. Esquema del nervio facial en la rata. Al entrar en la cara del animal, el nervio facial (VII par craneal) se divide en las ramas temporal (T), zigomática (Z), bucal (B) y mandibular (M); la lesión irreversible del nervio facial consiste en el corte de las ramas B y M (tijeras). B. Diseño experimental. Los animales se dividieron aleatoriamente en dos grupos: Sham (falsa cirugía de lesión, control) y Lesión irreversible del nervio facial; los animales lesionados, a su vez, se subdividieron en 5 grupos: 1D, 3D, 7D, 21D y 35D (que se sacrificaron a 1, 3, 7, 21 ó 35 días posteriores a la lesión). Los cerebros de los animales Sham y lesionados se procesaron para tinción inmunohistológica con el anticuerpo anti Iba-1, para la detección de células microgliales. C. Evaluación de la función motora. La correcta



lesión del nervio facial se corroboró por la ausencia del movimiento activo de las vibrisas del lado lesionado. Los primeros días posteriores a la lesión, los animales presentan las vibrisas paralizadas y completamente hacia atrás; una semana después de la lesión, los animales recuperan tonicidad en las vibrisas del lado lesionado, pero continúan con parálisis facial durante, al menos, 5 semanas post-lesión. Abreviaturas: Aclim: aclimatación por 7 días; Qx: cirugía, Inmuno: inmunohistoquímica.

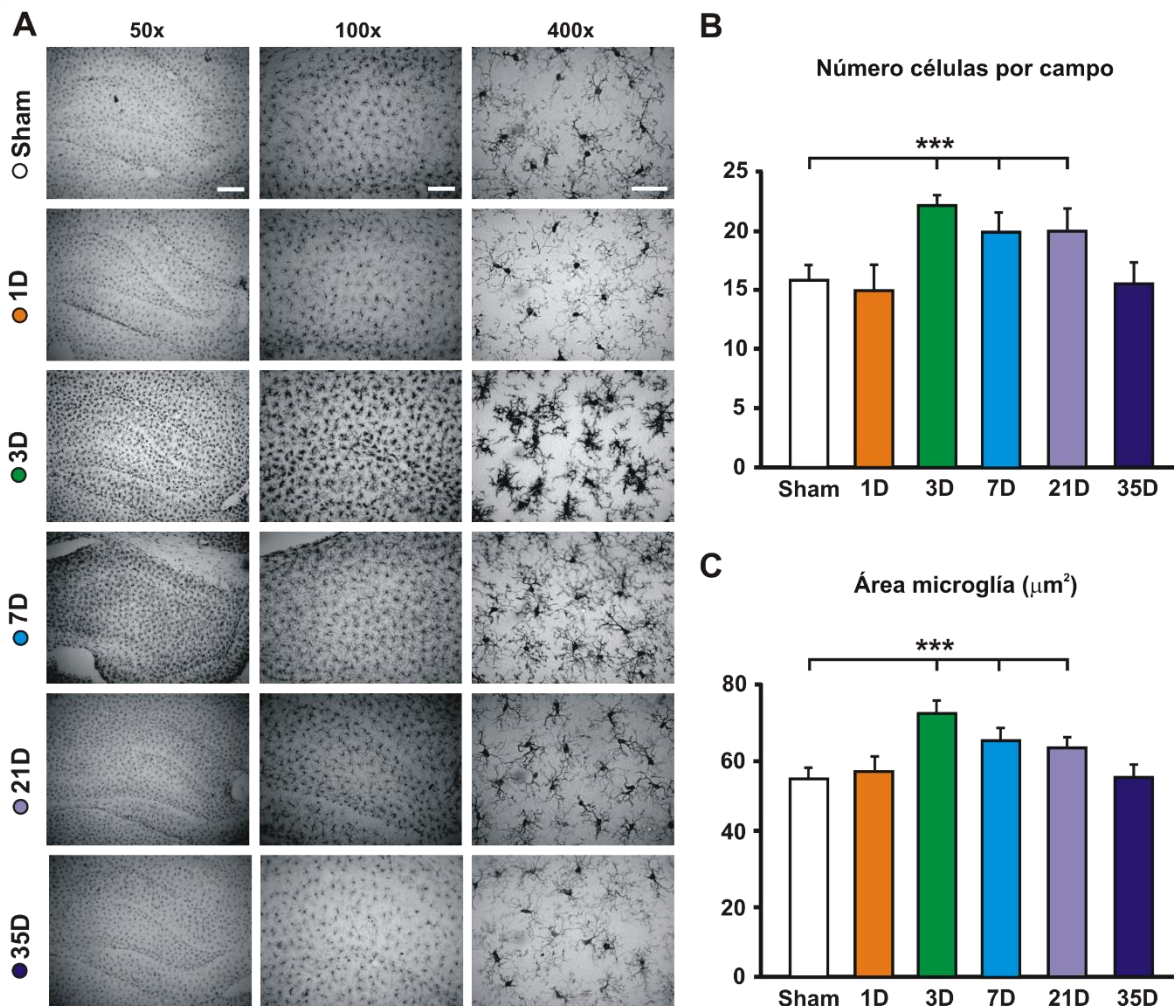


Figura 2. Modificación de las células microgliales en el hipocampo asociada a la lesión del nervio facial. A. Evolución temporal de los cambios en la microglía hipocampal. Se muestran microfotografías representativas de cada grupo (Sham y lesionados, sacrificados a distintos tiempos post-lesión), donde se visualiza la inmunorreactividad para Iba-1 en tejido hipocampal contralateral a la lesión. Aumentos: a la izquierda, 50x; centro, 100x y derecha, 400x. En las fotografías superiores (grupo control Sham) se observa una microglía típica del reposo, con ramificaciones delgadas y cuerpos celulares pequeños, similares a las encontradas en animales sacrificados el día posterior a la lesión (1D). A los tres

días se evidencia una proliferación y activación microglial (3D), que se revierte a las cinco semanas post-lesión (35D). Barras de calibración, izquierda: 300 mm; centro: 150 mm; derecha: 50 mm. B. Densidad de células microgliales. La cuantificación del número de células por campo muestra una proliferación significativa microglía a partir del tercer día post-lesión (3D), que se sostiene hasta el día 21D. C. Activación de las células microgliales. La cuantificación del área de los somas de las células microgliales, permite estimar su activación. Se observa un aumento significativo del área de estas células a 3, 7 y 21 días post-lesión (3D, 7D y 21D), que se revierte a los 35 días post-lesión (35D). \*:  $p < 0,001$ .